

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar  
Biológiai Intézet  
Mikrobiológiai Tanszék

**ÖSSZEHASONLÍTÓ DIVERZITÁS VIZSGÁLATOK A HÉVÍZI  
FORRÁSTÓ ÜLEDÉKÉNEK BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEIN**

**KRETT GERGELY**  
V. éves biológus

Témavezetők: Dr. Borsodi Andrea, Palatinszky Márton

TDK DOLGOZAT  
Budapest, 2008.

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>1</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>1</b>
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>4</b>
3.1. MINTAVÉTEL .....	4
3.2. CSÍRASZÁM BECSLÉS ÉS BAKTÉRIUMTÖRZSEK IZOLÁLÁSA .....	4
3.3. TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN KÖZÖSSÉGSZERKEZETI VIZSGÁLATOK .....	5
3.4. A BAKTÉRIUMTÖRZSEK GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA .....	7
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....</b>	<b>8</b>
4.1. A CSÍRASZÁMBECSLÉS ÉS A TÖRZS IZOLÁLÁS EREDMÉNYEI.....	8
4.2. A BAKTÉRIUMTÖRZSEK GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI.....	9
4.3. A TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN KÖZÖSSÉGSZERKEZETI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI .....	15
<b>5. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>19</b>

## 1. Bevezetés és célkitűzések

A Hévízi-tó Európa legmélyebb biológiailag aktív, tőzegmedrű forrása. Gyógyhatása miatt hazánk egyik közkedvelt turisztikai célpontja. Medrét vulkanikus és lápos iszap borítja, mely sajátos baktériumközösségeknek ad otthont. Mind a különleges iszap (illetve az abból származó ásványi anyagok) mind pedig az említett közösségek - melyek összetételét még ma is alig ismerjük - fontos szerepet játszhatnak a tó természetes állapotának és gyógyhatásának fenntartásában.

Jelen kutatásunk célja ennek a még rejtőzködő mikrobiális diverzitásnak a feltérképezése volt, különös tekintettel az Actinobacteria törzs tagjaira, melyek változatos – és ipari célokra is hasznosítható – enzimeik és anyagcseretermékeik révén meghatározó szerepet játszhatnak a tóban végbemenő folyamatok katalizálásában. A vizsgálatokhoz párhuzamosan alkalmaztunk tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszereket, melyek segítségével együttesen teljesebb kép tárult elénk a forrástó üledékének baktérium diverzitásáról, és alkalmunk nyílt a módszerek hatékonyságának és érzékenységének összehasonlítására is a baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának feltárásában.

## 2. Irodalmi áttekintés

A Hévízi-tó Közép-Európa legnagyobb kiterjedésű, melegvízi természetes gyógytava. Vize kettős eredetű, egy 26°C-os és egy 41°C-os forrásból származik. A tó hőmérséklete a nyár nagy részében 33-35°C körüli, míg ősszel és télen az időjárástól függően alacsonyabb, de sajátos hőszabályozó mechanizmusának köszönhetően nem csökken 22°C alá. A vízzel feltörő hőt a páraparok védik a lehűléstől, a többirányú és többsíkú áramlás pedig egységes hőmérsékletet biztosít az egész tóban. A tóvíz gyógyító hatása egyrészt a forrás révén a mélyből hozott különböző ásványi sóknak köszönhető, másrészt hozzájárul ehhez a tó sajátos iszapja is, amely átmenetet képez a tőzegek és a vulkanikus forrásiszapok között, tehát ún. kevert iszap (Schulhof, 1957) és 80 % szerves, valamint 20 % szerves anyagot tartalmaz. Az ásványi alkotórészek közt a mész van túlsúlyban, a szárazanyag 60 %-át adja. A mészkő mellett kvarc, földpát, csillám és amfibol ismerhető fel. A kémiai vizsgálatok az iszaptól a szerves anyagok közül a kalcium, a nátrium, a magnézium, a szilícium, a vas, az alumínium és a titán, valamint a szulfát, a hidrogén-karbonát, a klorid és a jód vegyületeit mutatták ki. A víz alatt elkorhadó növényi anyagok maradványai a forrásvíz által fellazított tőzegekre szerves részeit jelentik. A fenéküledék nagy mennyiségű növényi eredetű szerves anyagot tartalmaz. Ennek nagy ré-

sze humin+lignin (4,795 %), huminsavak (1,277 %), cellulóz (0,403 %), hemicellulóz (1,633 %), továbbá oldható (0,905 %) és lebomlatlan (0,901 %) szerves anyag (Csajághy, 1949). A hévízi iszap hormonális hatású ösztrogén anyagokat is tartalmaz. A víz kalcium-magnézium-hidrokarbonát típusú. A kalcium és a magnézium a felszínhez közeli dolomit-rétegekből származik. A kálium, a szilícium és a lítium tartalom, valamint a jelentékeny rádium emanáció, amelynek nagysága 0,22-0,28 millimikrocurie liter<sup>-1</sup> valószínűleg a triász rétegek alatt fekvő permi kőzetek mélységéből kerül a feltörő vízbe. A tó vize kénvegyületeket is tartalmaz. A kénvegyületek egyik része a lápnövényzetből származik, és állandóan pótlódik, másik része a mélyből tör fel. A vízben oldott szén-dioxid, azaz szénsav, a vulkáni utóműködés utolsó szakaszára jellemző. Az említettekén kívül még a metán, a közel semleges kémhatású (pH 7,16) víz fontos alkotórésze (Schulhof, 1957). A vízben és az üledékben élő baktériumközösségek ugyancsak jelentős szerepet játszhatnak a tó természetes állapotának fenntartásában, továbbá a mikroorganizmusok és/vagy anyagcseretermékeik is felelősek lehetnek a gyógyhatás kialakításáért.

A Hévízi-tó üledéke sajátos bakteriológiai viszonyokat tükröz. Szemben más tavak üledékével, Clemente (1981) az üledék felszíni rétegeiből a folyók iszapjára jellemzően nagyszámú streptomycetát mutatott ki, de más tavak üledékében előforduló micromonosporákat is izolált. Ez a bakteriológiai szempontból átmeneti karakter feltehetően a forrásból táplálkozó tó vizének átfolyó jellegéből következhet. A 80-as évek elején részletes mikrobiológiai vizsgálatokat végeztek a Hévízi-tó aktinomiceta közösségein a tóprofil négy szintjéből gyűjtött mintákon. Kimutatták, hogy a baktériumok száma majdnem minden esetben meghaladta az aktinomicetákét, melyek a vízmintákban egyáltalán nem fordultak elő. Ebből arra következtettek, hogy az aktinomiceták a tavi planktonnak nem tagjai, hanem szilárdan rögzülnek az iszaprészecskéken. A csíraszám megoszlások alapján a legnagyobb mikrobiális aktivitást az üledék legfelső rétegében találták. A víz/iszap határfelületen a teljes lemezeltető baktériumbióta 10 %-át aktinomiceták alkották, de mennyiségük a mélységgel fokozatosan csökkent. A mélységgel az aktinomiceták között a *Streptomyces*ek száma gyorsan csökkent és 20 cm-nél már a sugárgomba frakcióban a *Micromonosporák* domináltak. Ugyanitt szórványosan *Nocardia* és *Microbispora* is előfordult. Legnagyobb számban a *S. nigrifaciens* és a *S. diastatochromogenes* fajok képviselői kerültek elő. A kitenyészített *Micromonospora* törzsek között legnagyobb gyakorisággal egy *Micromonospora heviziensis* névvel jelölt faj képviselői fordultak elő (Clemente és Szabó, 1982). A Hévízi-tó iszapjából kitenyészített mikromonosporák többsége, így a *M. heviziensis* is cellulotikus aktivitással rendelkezett. Szintén ennek a munkának az eredménye volt a *Microbispora amethystogenes* izolálása, melyet Európában elsőként sikerült kimutatniuk. Ez a faj nevét a kolóniái közelében felhalmozó-



dó lila színű jódkristályokról kapta (Clemente, 1982). 1989-ben újabb vizsgálatok folytak a tó üledékének felső rétegében abból a célból, hogy megtudják, fellelhetők-e még a tóra jellemző mikroorganizmusok (a *M. hevizensis* és a *M. amethysogenes*) valamint, hogy megjelentek-e új mikroorganizmus típusok illetve fajok a tóban és azok milyen arányban szerepelnek. Ennek eredményeként kiderült, hogy a lemezeltető baktériumok száma egy nagyságrenddel emelkedett ( $2,7 \cdot 10^5$ -ről  $1,6 \cdot 10^6$ -ra 1 g nedves iszapban), amiből a tó elszennyeződésére és az ülepedő könnyen bontható, nem tözeg- vagy humuszkarakterű szerves anyagok fokozódó degradálódására következtettek. A megemelkedett csíraszám értékek ellenére az aktinomiceták mennyisége a korábbi értékek alá süllyedt. A *Micromonospora carbonacea* és a *M. chalcea* jelenlétét nem, az egykor oly elterjedt *M. hevizensis* pedig csak kis számban tudták kimutatni. Az új összetételű közösség domináns alakja a *M. purpureochromogenes* lett. 1996-ban a Ponyi által kezdeményezett Biomonitoring Program keretében környezetbakteriológiai vizsgálatokat is végeztek, melyek során a baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak funkció és típus szerinti meghatározása volt a cél. Kimutatták, hogy a tóvíz aerob csíraszama alig haladta meg az  $1000 \text{ CFU ml}^{-1}$  értéket. A vízben a spórás állapotban lévő aerob baktériumok száma elenyésző volt, anaerob spórások pedig nem fordultak elő.

Az üledékből korábban kitenyésztett *Streptomyces* és *Micromonospora* nemzetségek az Actinobacteria törzs tagjai. Az ide tartozó taxonok általános jellemzője a nagy G+C tartalom, többen közülük – különösen a Streptomycetaceae család képviselői – hatékony antibiotikum termelők és a gyógyszeriparban használatosak, mások fontos szerepet játszanak különböző nehezen bontható szerves anyagok dekompozíciójában. Ugyanakkor még napjainkban is kevés biokémiai és molekuláris marker ismeretes, amelyek segítségével az aktinobaktériumok könnyen és egyértelműen elkülöníthetők lennének más taxonoktól. Egy 23S rRNS inzert kivételével csupán három széles körben elterjedt fehérje - a citokróm-c oxidáz 1. alegysége, a CTP szintetáz és a glutamil tRNS szintetáz - mutációjának (inzerációjának vagy deléciójának) vizsgálata használatos erre a célra (Gao és Gupta, 2005).

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Mintavétel

A vizsgálatainkhoz felhasznált üledékmintákat a Hévízi forrástó két eltérő pontjáról (a parthoz közeli H3-as jelzésű és a kráterhez közeli H4-es jelzésű helyről) vettük 2007. október 1-jén Hargrave-féle mintavevővel 2-3 méteres vízoszlop alól (1. ábra). Mindkét mintavételi helyen két eltérő üledékmélységből származó mintát gyűjtöttünk (az egyiket tóvíz-üledék határrétegéből, a másikat 20 cm-es üledékmélységből). Az egyenként mintegy 200 g-nyi mintát külön steril üvegedényekbe helyeztük, és az egy napon belül történő laboratóriumi feldolgozásig 6-8°C-on tároltuk.



1. ábra Mintavételi helyek a Hévízi forrástavon

#### 3.2. Csíraszám becslés és baktériumtörzsek izolálása

Feldolgozás során az üledékmintákból steril víz felhasználásával tízes alapú hígítási sort készítettünk, majd ennek minden tagjából összesen kilencféle tápagar lemez felszínére szélesztettünk. Mivel kutatásunk célja a tóvíz üledékében élő Actinobacteria közösség tagjainak minél szelektívebb kitenyésztése volt, ezért a táptalajválasztásunkat is erre optimalizáltuk az irodalmi adatok, illetve a korábbi vizsgálatok eredményei alapján. A felhasznált táptalajok a következők voltak:

1. Keményítő-kazein agar (Küster és Williams, 1964)
2. Maláta-élesztőkivonat agar (Pridham és mtsai, 1956)
3. Difco™ Actinomycete izoláló agar (Difco Laboratories, 1962)
4. Keményítő-kazein agar (Waksman, 1961)
5. *Micromonospora megalomicea* agar (DSMZ-127; [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de))
6. Kolloidális kitin agar (Wohl és McArthur, 1998)
7. Czapek agar (DSMZ-83; [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de))
8. KingB medium (Cowan, 1974)
9. Zab agar.

A két hetes, 28°C-os inkubációt követően csíraszám becslést végeztünk, majd a kifejlődött különálló telepeket véletlenszerűen a tápagar lemezekkel azonos összetételű ferde agarra izoláltuk.

Az egyes minták jelölése a mintavétel című pontban bevezetett betűjelzések és sorszám segítségével történt a következőképpen:

H3F – Hévízi forrástó 3-as mintavételi pont felszíni üledékminta

H3M – Hévízi forrástó 3-as mintavételi pont 20 cm mély üledékminta

H4F – Hévízi forrástó 4-es mintavételi pont felszíni üledékminta

H4M – Hévízi forrástó 4-es mintavételi pont 20 cm mély üledékminta

### **3.3. Tenyésztéstől független közösségszerkezeti vizsgálatok**

A molekuláris biológiai vizsgálatok során az üledékmintákat centrifugálással tömörítettük (14000 rpm, 2 perc), majd a felülúszót pipettával eltávolítottuk annak érdekében, hogy a minta nagy víztartalma ne befolyásolja a DNS izolálás során alkalmazott oldatok összetételét. Az 500-500 mg-nyi tömör üledékből DNS izoláló kit segítségével (Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit, Mo-Bio), kémiai és mechanikus sejtfeltárást alkalmazva, a protokollnak megfelelően kivontuk a közösségi DNS-t.

A DNS izolátumokkal két irányba dolgoztunk tovább. Egyrészt polimeráz láncreakció (PCR) alapú hosszheterogenitás vizsgálatot (LH PCR) végeztünk, ami a 16S rRNS génjének taxononkénti természetes hossz-variabilitásán alapul. Ennek során a 16S rDNS első harmadát - mintegy 500 bázispárnyi szakaszt - felsokszoroztuk PCR segítségével, mely az összes vizsgálati módszer esetében az alábbi körülmények között zajlott:



*A PCR összetétele (mintánként):*

10x PCR puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTP	10 µl
dH <sub>2</sub> O	28 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverz primer	0,5 µl
Taq polimeráz	1 µl
DNS templát	1 µl
Össztérfogat	50 µl

*A PCR hőprofilja:*

kezdeti denaturáció	98°C	5 min
Taq bemérés	84°C	
denaturáció	94°C	30 sec
anneláció	52°C	30 sec
extenzió	72°C	1 min
végző extenzió	72°C	30 min
hűtés	4°C	∞

Vizsgálataink során a PCR-hez felhasznált reagensek:

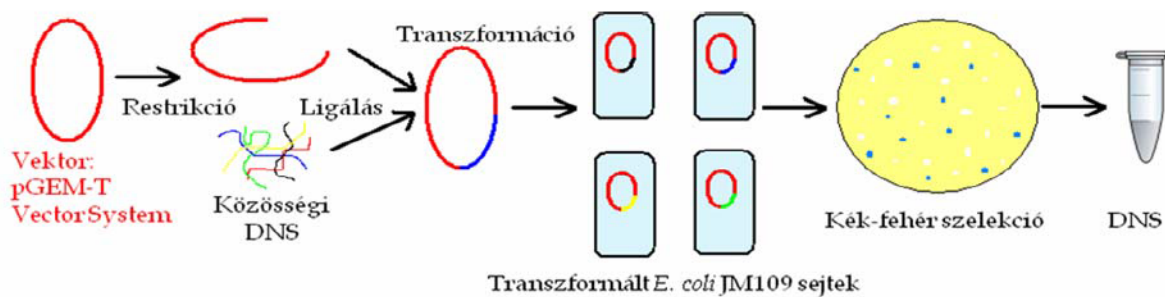
10xPCR puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
MgCl<sub>2</sub> oldat (Fermentas) (25 mM)  
dNTP keverék (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP)  
Forward primer (3,25x10<sup>-5</sup>M)  
Reverz primer (3,25x10<sup>-5</sup>M)  
Desztillált víz (steril, HPLC tisztaságú)  
LC Taq (Fermentas)

Az amplifikációhoz felhasznált két primer a TET63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') és az 519r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') közül a forward fluoreszcensen jelölt volt, ezzel lehetővé téve az ABI PRISM 310 Genetic Analyser kapilláris elektroforézis készülékkel történő detektálást. A PCR termékeket etanol precipitációval tisztítottuk és koncentráltuk. A 30 µl HPLC tisztaságú vízben feloldott PCR termékek 1 µl-ét, és 0,6 µl TAMRA500 molekulásúly standardot 12 µl formamidba kevertük, és 5 percig 98°C-on denaturáltuk. A minták 2 perc jégen történő inkubálás után kerültek a kapilláris elektroforézis készülékbe. Az elektroforézis körülményei: polimer: POP-4; injektálási idő: 8 sec; elektroforézis feszültség: 15 kV; kapilláris hőmérséklet: 60°C; futási idő: 35 perc. A nyers adatokból a kromatogramokat Gene Mapper ver. 3.7 szoftverrel állítottuk elő, melyen a csúcsok az egyes közösség alkotókat, azok magasságarányai pedig a relatív gyakoriságukat reprezentálják.

A DNS izolátumok másik részét klónkönyvtár létrehozásához használtuk. Ennek során a 16S rDNS egy szakaszát felsokszoroztuk a H3M minta esetén 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') és 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerek, illetve a H4M minta esetén 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') és 519r (5'-TTACCGCGGCTGCTGGC-3') primerek segítségével. A reakció során alkalmazott Taq DNS polimeráz terminális transzferáz aktivitásának köszönhetően az amplikokat egy túlnyúló



adenin nukleotiddal látja el, alkalmassá téve azokat TA-klónozó vektorokba történő ligálásra. A PCR termékeket tisztítás után (PCR-M kit, Viogene) klónozó vektorba ligáltuk (pGEM-T Vector System, Promega), *E. coli* JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk, és ampicillin tartalmú LB agarlemezre szélesztettük. Könyvtáranként a fehér (inzeret tartalmazó vektorral bíró) klónteletet LB lemezre pontoztunk át, majd újabb 24 órás inkubálás után a telepekből a DNS-t 96 lyukú mikrotiter lemezen (PCR plate-en), 30-30 µl HPCL tisztaságú vízben, 5 perces, 98°C-os inkubálással tártuk fel. A lemezeket ezután 3 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk, hogy a sejttermelékét kiülepítsük. A klónkönyvtárakat a feldolgozásig -20°C-on tároljuk (2. ábra).



2. ábra A klónkönyvtár létrehozásának lépései

Az inzeret szekvencia kinyeréséhez a DNS izolátumokból két PCR-t végeztünk. Egyet vektor specifikus M13 primerekkel, és egy nested PCR-t 27f és 1492r primerekkel a H3M mintavételi pontról származó és 63f 519r primerekkel a H4M mintavételi pontról származó minták esetében, amely már kizárólag az inzeret szekvenciát amplifikálja fel. Az így kapott PCR termékeket restriktions enzimekkel (*MspI* és *BsuRI*) hasítottuk, a különféle hasítási mintázatok alapján az egyes szekvenciákat csoportosítottuk, a mindkét enzimre hasonló mintázatot adókat azonos csoportba helyezve. Az csoportok egy-egy reprezentánsának szekvencia elemzését ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit segítségével végeztük 519r primer alkalmazásával a gyártó utasításainak megfelelően.

### 3.4. A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálata

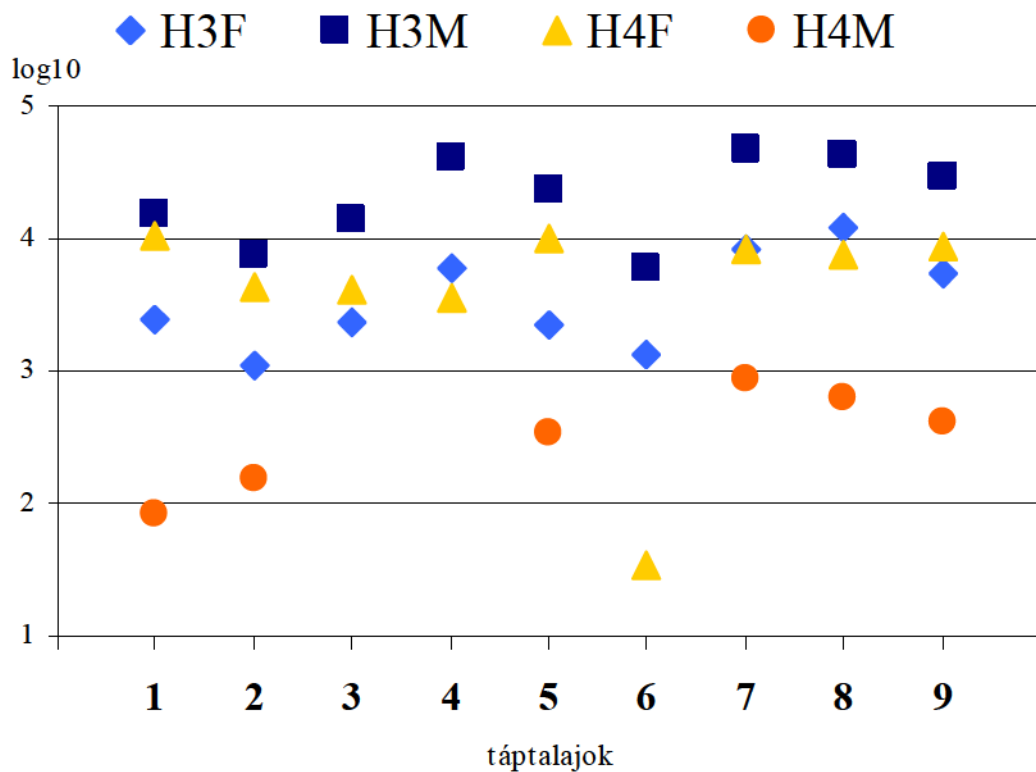
A genotípusos vizsgálat során a baktérium törzsek tiszta tenyészeiből elsőként DNS-t izoláltunk G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az izolált DNS-ből a 16S régiót polimeráz láncreakció segítségével szaporítottuk fel 27f és 1492r primereket használva. A PCR termékek minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os agaróz gélben. Ezután a felsokszorozott 16S rDNS

szakaszokat kétféle restriktív endonukleázzal (*Alu1* és *Hin61*) hasítottuk, majd agaróz gélelektroforézissel 2 %-os agaróz gélben megfuttattuk. Ezáltal láthatóvá váltak az egyes hasítási mintázatok, amely alapján a baktériumtörzsek csoportosítását elvégeztük, majd csoportonként egy-egy reprezentáns szekvenciáját meghatároztuk a klónok analizálásánál említetteknek megfelelően.

## 4. Eredmények és megvitatásuk

### 4.1. A csíraszámbebecslés és a törzs izolálás eredményei

A mintavétel időpontjában a tó víz-üledék határrétege átlagosan  $8,46 \times 10^3$ , a 20 cm mélyről származó üledék  $1,54 \times 10^4$  csíraszám értékkel (CFU g<sup>-1</sup>) volt jellemezhető (3. ábra). A forráskrátertől távolabb eső (H3) és az ahhoz közeli (H4) mintavételi pontok felszíni mintáinak átlagos csíraszám értékei ( $6,6 \times 10^3$ , valamint  $1,03 \times 10^4$ ) között nagyjából másfélszeres volt az eltérés. A 20 cm mélyről származó üledékmintákból számoltuk valamennyi táptalajon külön-külön és az átlagokat tekintve is a legnagyobb ( $3,03 \times 10^4$ ) és a legkisebb ( $4,79 \times 10^2$ ) csíraszám értéket. Egy adott mintán belül az alkalmazott táptalajtípusok függvényében akár egy nagyságrendnyi eltérést is tapasztaltunk a becsült csíraszám értékek között. Táptalajtípustól függetlenül a kráterhez közeli (H4) minta esetében a felszíni, a parthoz közeli (H3) minta esetében a mélyebb üledékrétegben kaptunk nagyobb csíraszám értékeket, továbbá a H3-as mintavételi ponton az eltérő mélységből származó üledékminták csíraszám értékei között rendre kisebb különbséget tapasztaltunk, mint a H4-es pontról származó minták esetében. A legnagyobb csíraszám értékeket a 7-es (Czapek agar), a legkisebbeket a 2-es (malátá-élesztőkivonat agar) és a 6-os (kolloidális kitin agar) táptalajról becsültük, melynek oka lehet, hogy az előbbi nagyobb mennyiségű könnyebben hasznosítható, az utóbbiak kevesebb illetve nehezebben hasznosítható szénforrásokat tartalmaztak. A kapott csíraszám értékek alakulása arra enged következtetni, hogy az üledékrétegek aerob baktériumainak mennyisége területileg és mélységileg is inhomogén eloszlású. Ennek lehetséges oka, hogy a forráskráterhez közelebbi (H4) mintavételi ponton az üledék folyamatosan mozgásban van, míg a Hévízi forrástó északi partjához közeli (H3) mintavételi ponton a mélyebb üledékrétegek is zavartalanok, így ott stabilabb, állandóbb közösség alakulhatott ki.



3. ábra A Hévízi forrástó üledékéből tenyésztéssel becsült baktérium csiraszám értékek az alkalmazott táptalajok és a minták szerint

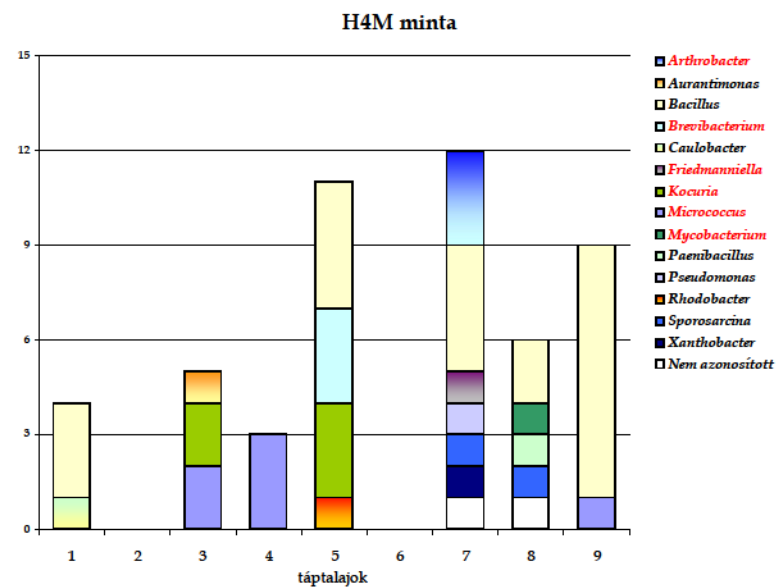
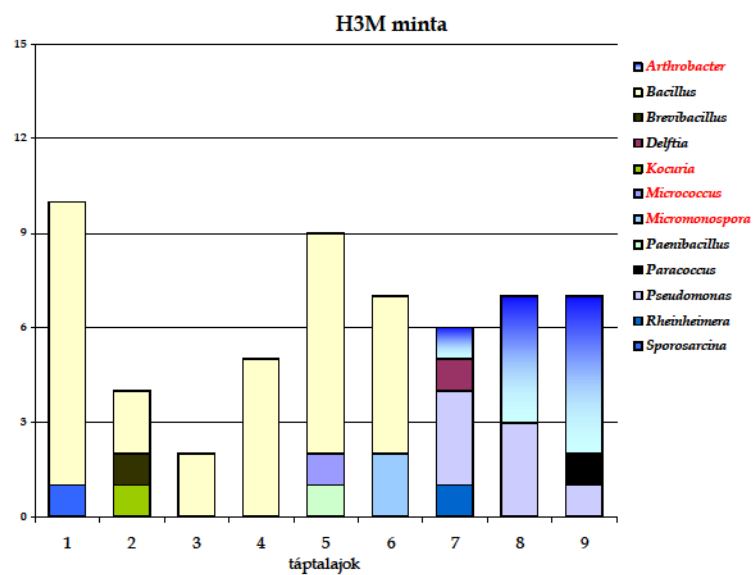
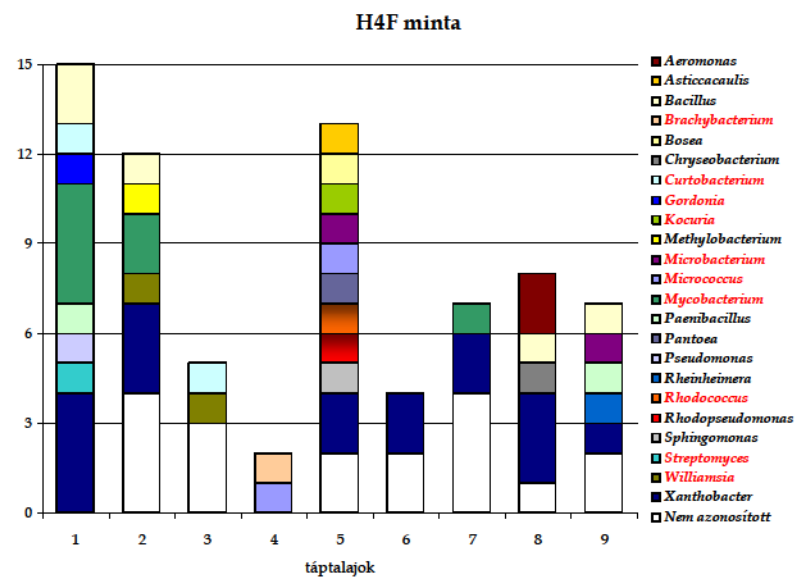
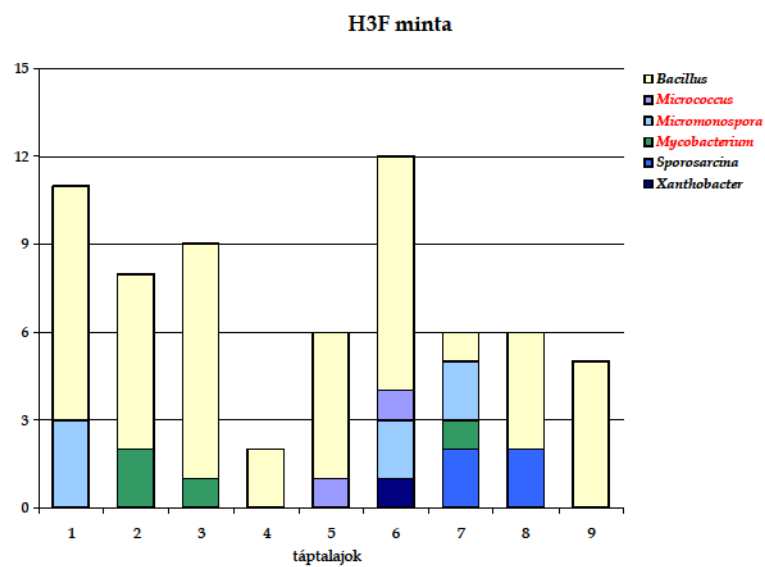
#### 4.2. A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálatának eredményei

Az összesen 245 (H3F: 65; H3M: 57; H4F: 73; H4M: 50) tiszta tenyészetekből izolált DNS 16S rRNS-t kódoló régióját polimeráz láncreakcióval felszaporítottuk, majd restriktációs enzimekkel hasítottuk és az így kapott mintázatok alapján 122 ARDRA csoportot (H3F: 26; H3M: 24; H4F: 44; H4M: 28) különítettünk el. Eddig 102 reprezentáns szekvencia analízisét és illesztését végeztük el. A BLAST program segítségével meghatározott baktériumtörzsek mintavételi hely és táptalajtípus szerinti megoszlását a 4. ábra szemlélteti, melynek vízszintes tengelyén számokkal jelöltük a tenyésztéshez használt kilencféle táptalajt, a függőleges tengely mentén az egyes táptalajokról tenyésztésbe vont és szekvencia analízisnek alávetett baktériumtörzsek száma olvasható le. A Hévízi forrástó üledékéből kitenyésztett törzsek között az Actinobacteria (*Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Friedmanniella*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*,

*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* és *Williamsia*), a Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* és *Sporosarcina*), az  $\alpha$ -proteobacteria (*Asticcacaulis*, *Aurantimonas*, *Bosea*, *Caulibacter*, *Paracoccus*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas* és *Xanthobacter*), a  $\beta$ -proteobacteria (*Delftia*), a  $\gamma$ -proteobacteria (*Aeromonas*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* és *Rheinheimera*) és a Bacteroidetes (*Chryseobacterium*) nemzetségeinek képviselőit sikerült azonosítanunk. A mutatja, hogy az alkalmazott táptalajok eltérő szelektivitással voltak alkalmasak a különféle nemzetségekbe sorolt baktériumtörzsek kitenyésztésére. Bár egyetlen általunk alkalmazott táptalaj sem bizonyult teljesen szelektívnek az Actinobacteria törzs tagjaira, mégis valamennyi táptalajról sikerült tenyésztésbe vonni e törzs hévízi-tavi képviselőit. A 4-es táptalajról kitenyésztett törzsek között kaptuk a legkisebb, az 5-ös táptalaj esetében pedig a legnagyobb diverzitást. A kráterhez közeli (H4) mélyebb és felszíni üledékmintákból is nagyobb filogenetikai diverzitást határoztunk meg, mint a part menti (H3) mintákból. A mintavételi mélység alapján a partközeli (H3) a mélyebb, a kráterhez közeli (H4) mintavételi ponton a felszíni minta mutatott nagyobb diverzitást. Az azonosított törzsek közül a *Bacillus* és a *Micrococcus* nemzetség képviselői kerültek elő mind a négy mintából. A part közeli (H3) mintavételi pontról a *Sporosarcina*, a kráterhez közelebbi (H4) mintavételi pontról a *Kocuria*, a *Mycobacterium*, a *Paenibacillus*, a *Pseudomonas* és a *Xanthobacter* nemzetségek tagjait azonosítottuk a felszíni és a mélyebb üledékmintákból egyaránt. Ugyanakkor a mindkét helyről (H3 és H4) származó felszíni (F) minták esetében a *Mycobacterium* és a *Xanthobacter*, míg a mélyebb (M) üledékmintáknál az *Arthrobacter*, a *Kocuria*, a *Paenibacillus*, a *Pseudomonas* és a *Sporosarcina* nemzetségek képviselői voltak jelen.

A H3-as mintavételi pont zavarástól mentes körülményei feltehetően állandóbb baktériumközösségek kialakulásának kedveznek, innen a legtöbbször a táptalajról és a legnagyobb arányban (42 %) a *Bacillus* nemzetség fajait tenyésztettük ki. A baktériumtörzsek a *B. idrinesis*, *B. megaterium*, *B. macroides*, *B. simplex*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. barbaricus*, *B. indicus*, *B. licheniformis* fajaival mutattak nagy szekvencia hasonlóságot. A legnagyobb baktérium és egyben Actinobacteria diverzitás (23 illetve 10 nemzetséggel) a kráter közeli felszíni mintában, míg a legkisebb (6 illetve 3 nemzetséggel) a part menti felszíni mintában mutatkozott. Ez egyúttal a Hévízi forrástó területenként és üledékmélységenként is nagymértékben változó és eltérő fajösszetételű és feltehetően aktivitású baktériumközösségre utal.





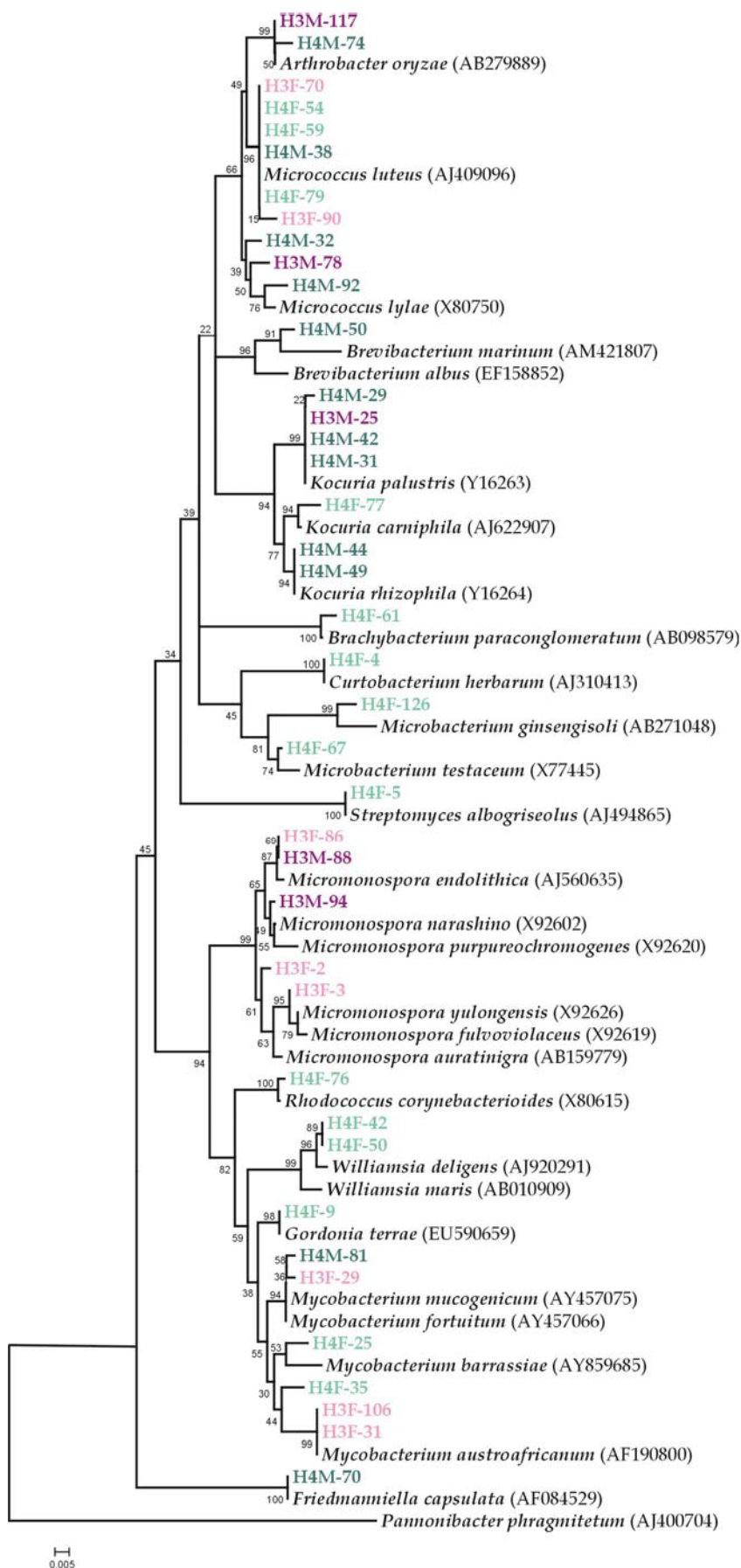
4. ábra A Hévízi-tó üledékéből kitenyésztett baktériumtörzsek nemzetség szintű diverzitásának megoszlása az alkalmazott táptalajok és a minták szerint

Az Actinobacteria törzs képviselői izolátumaink 27 %-át tették ki, a velük legközelebbi rokonságban álló típus törzseket a neighbour-joining módszerrel és Kimura-2 korrekcióval készült filogenetikai dendrogram (5. ábra) szemlélteti. A törzs tagjai közül legnagyobb arányban az *Arthrobacter* (19 %), a *Micrococcus* (18 %), a *Mycobacterium* (18 %), a *Micromonospora* (13 %) és a *Kocuria* (10 %) nemzetségek képviselőit izoláltuk.

Az *Arthrobacter* nemzetséget csupán egyetlen faj, a Kageyama és mtsai által 2008-ban egy japán rizsföldről leírt *A. oryzae* képviselte, mely mindkét mintavételi helyen, de csak a mélységi mintákban fordult elő. A nemzetség fajait leggyakrabban talajmintákból izolálták, de kimutatták már édesvízi halakból is (Jones és Keddie, 2006). A nemzetség képviselőire jellemző, hogy jól tűrik a kiszáradást, a tápanyaghiányt, sokféle szerves anyag hasznosítására képesek és fontos szerepet játszanak a talaj szerves komponenseinek mineralizálásában. Egyes fajaik bontani tudnak bizonyos herbicideket és peszticideket, mások fontos növényi hormontermelők (Barea és mtsai, 1976).

A *Micrococcus* nemzetségbe tartozó, és mind a négy hévízi-tavi mintából előkerült törzsek a legnagyobb szekvencia egyezést a *M. lylae* és a *M. luteus* típus törzsével mutatták. Az utóbbi faj jellegzetes képviselője az emlősök - leginkább az ember - bőrfelületén élő mikrobiótának, másodlagosan azonban szinte bárhol előfordulhat (Kocur és mtsai, 2006). Bár a *M. luteus* opportunistá patogénként is számon tartják, a nemzetség képviselőit felhasználják húsételek tartósítására és az általuk szintetizált hosszú szénláncú ( $C_{21}$ - $C_{34}$ ) alifás szénhidrogének folytán is gazdasági érdeklődésre tartanak számot (Kloos és mtsai., 1974).

A *Mycobacterium* nemzetségnek a H3M minta kivételével mindenhol kitenyészett hévízi-tavi képviselői a legnagyobb szekvencia egyezést a *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. barrassiae* és *M. austroafricanum* típus törzsek szekvenciáival mutatták. A nevezett fajok mind a gyors növekedésű, nem tuberkulotikus mikobaktériumok közé sorolhatók (Hartmanns és mtsai, 2006), bár pl. a *M. barrassiae* törzseket klinikai mintákból is kimutatták már (Adékambi és mtsai, 2006). A *M. fortuitum* a környezeti (pl. talaj) mintákból leggyakrabban izolált mikobaktériumok közé tartozik (Tsukamura, 1984). A *M. austroafricanum* faj törzseiről leírták, hogy szennyezett területek bioremediációjában játszhatnak fontos szerepet azért, hogy képesek az egyébként igen nehezen bontható izoooktán (2,2,4 trimetilpentán) hasznosítására (Solano-Serena és mtsai., 2000).



5. ábra A Hévízi-tó üledékéből kitenyésztett aktinobaktérium törzsek filogenetikai dendrogramja

Bár a *Micromonospora* nemzetség tagjait régóta nagy számban tenyésztik ki bázikus és semleges kémhatású talajokból (Jensen, 1930; 1932), mégis jellegzetes előfordulási helyüket az édes és sós vizek jelentik. Munkánk során a *M. fulvoviolaceus*, *M. yulongensis*, *M. auratinigra*, *M. endolithica*, *M. narashino*, továbbá a korábbi hévízi-tavi fenotípusos vizsgálatok alapján domináns *M. purpureochromogenes* faj képviselőjét csupán a forráskrátertől távolabb eső (H3) mintavételi pontról sikerült kimutatnunk, ami feltehetően az állandóbb körülmények preferenciájából adódhat. Mint hatékony cellulóz-, lignin- és kitinbontók, alapvető szerepet tölthetnek be a vízi környezetek anyagforgalmi folyamataiban (Erikson, 1941).

A *Kocuria* nemzetséget Stackebrandt és munkatársai hozták létre 1995-ben a korábbi *Micrococcus* nemzetség felosztása során. A H3F minta kivételével mindenhol kitenyésztett hévízi-tavi törzsek a Soroksári–Dunaágban élő keskenylevelű gyékény rizoplánjából leírt *K. palustris* és *K. rhizophila* (Kovács és mtsai, 1999), valamint a *K. carniphila* fajok szekvenciáival mutattak nagyfokú hasonlóságot.

A hévízi-tavi törzsek között kizárólag a kráterhez közelebb eső (H4) mintavételi helyről kerültek elő a kisebb arányban előforduló aktinobaktériumok. A felszíni mintából a *Gordonia*, a *Williamsia*, a *Rhodococcus*, a *Brachybacterium*, a *Curtobacterium*, a *Microbacterium*, és a *Streptomyces*, a mélyebb mintából a *Brevibacterium* és a *Friedmanniella* nemzetségek egy-egy fajának képviselőit azonosítottuk. A sejtfalukban eltérő szénlánc hosszúságú mikolsavat tartalmazó *Gordonia*, *Williamsia* és *Rhodococcus* nemzetségek képviselői a természetben széles körben elterjedtek, egyes törzseik különféle xenobiotikumok bontására képesek, mások klinikai mintákból izolálhatók (Ruimy és mtsai, 1995; Stach és mtsai, 2004; Yassin és Hupfer, 2006). Az általunk is izolált corineform, mikolsavat nem tartalmazó *Brachybacterium paraconglomeratum* faj képviselőjét először baromfi trágyából írták le (Takeuchi és mtsai, 1995). A *Curtobacterium* és a *Microbacterium* nemzetségek képviselői jellegzetes tagjai a növények felszínét benépesítő baktériumközösségeknek (Behrendt és mtsai, 2002). A *Streptomyces* nemzetségbe tartozó fajok közül számos hatékony antibiotikum termelő képessége folytán már régóta gyógyszeripari felhasználás alatt áll (Hinorouchi, 2007). Az általunk azonosított egyetlen *S. albogriseolus* fajként azonosított törzset a kráterhez közeli üledékfelszíni mintából tenyésztettük ki. A *Friedmanniella* nemzetség jelenleg ismert négy faja közül a hévízi-tavi törzsek esetében a legnagyobb szekvencia egyezést az eleven iszapból leírt *F. capsulata* típus törzsszel (Maszenan és mtsai, 1999) kaptuk. A *Brevibacterium* nemzetség képviselői sokféle élőhelyen - többek között az emberi bőrön (Pitcher és Noble, 1978), tejtermékekben (Sharpe és mtsai, 1976) is - előfordulnak, a hévízi-tavi izolátum a legnagyobb

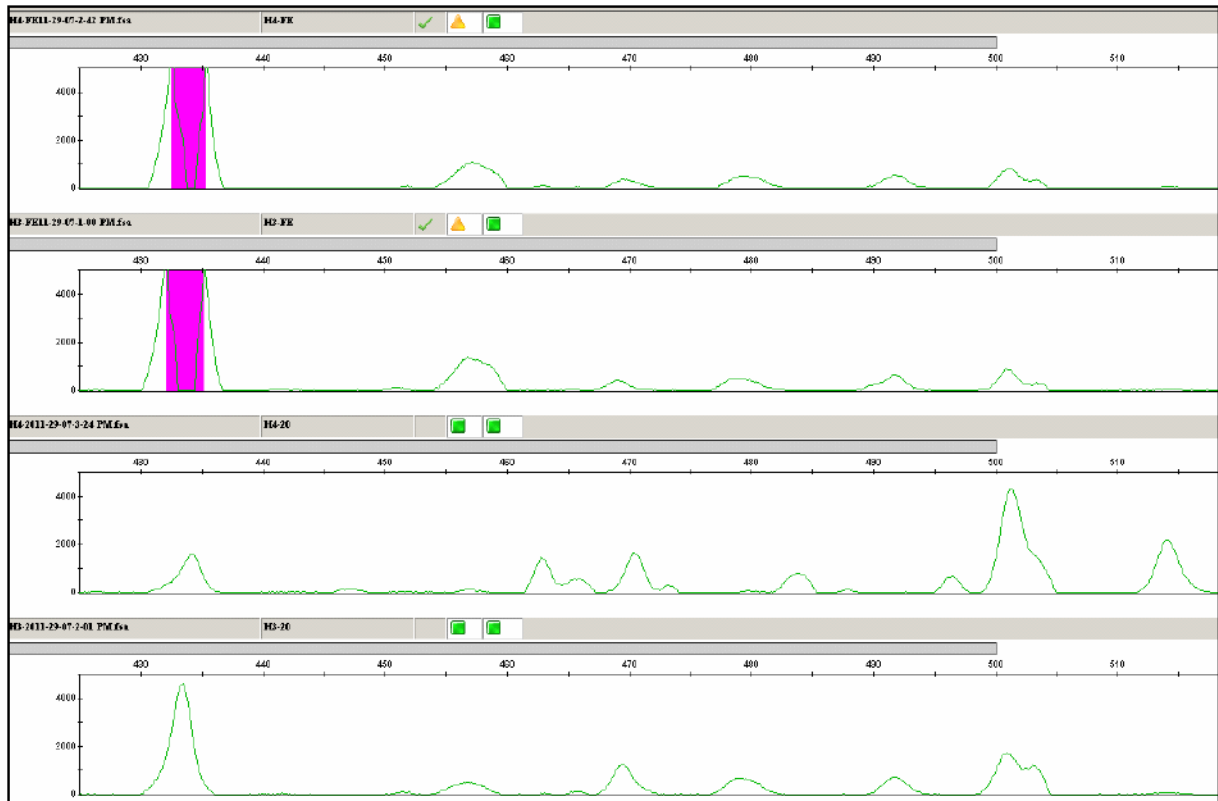


hasonlóságot a Hwasun környéki tengervízből (Dél-Korea) izolált *B. marinum* típus törzs (Lee, 2008) szekvenciájával mutatta.

Négy törzs esetében kis egyezést kaptunk már leírt fajok típus törzseinek szekvenciáival, ezek nagy valószínűség szerint a *Micrococcus*, *Epilithonimonas*, *Rhodobacter*, valamint *Brevibacterium* nemzetségek képviselői.

#### **4.3. A tenyésztéstől független közösségszerkezeti vizsgálatok eredményei**

A kivont közösségi DNS-el végzett PCR alapú hosszheterogenitás vizsgálat (LH PCR) során kapott közösségi ujjlenyomat alapján a felszíni minták egymáshoz rendkívül hasonlóan mutatkoztak egy kiugróan domináns, és 11 kevésbé jelentős csoporttal (6. ábra). A H3-as mintavételi pontról származó mélyebb minta közösségszerkezete is a felszíniekhez hasonló mintázatot adott a legdominánsabb csoport kisebb jelentőségét kivéve. Taxonómiaiilag a legdiverzebb közösséget a H4M minta mutatta. A klónkönyvtárak elemzése során a klónok inzerthossz megoszlásának figyelembevételével sikerült néhány domináns csúcshoz tartozó nagyobb filogenetikai csoportot azonosítanunk. Eszerint a 4. ábrán látható legerősebb, és minden mintában a 435 bp környékén megjelenő csúcs a Cyanobacteria törzsnek volt megfeleltethető, melynek képviselői a jól megvilágított üledékfelszínen mindkét mintavételi ponton tömegesen voltak jelen, de a partközeli (H3) minta mélyebb üledékében is jelentős arányban előfordultak. Az anoxikus fotoszintetizáló prokarióták körébe tartozó, de mixotróf anyagcsere-re képes Chloroflexi törzs képviselőit a 460, 500 és 515 bp-nál található csúcsokkal azonosítottuk, melyek szintén a felszíni mintákban mutattak tömegesebb megjelenést, de a mélyebb mintákból is kimutathatók voltak. A 470 bp-nál lévő Bacteroidetes és az 500 bp-nál lévő  $\delta$ -Proteobacteria csoportok képviselői is mind a négy mintában előfordultak, de a mélyebb üledékrétegből származó mintákban nagyobb arányban, mint a felszíniekben. Ennek hátterében feltehetően a Bacteroidetes törzsbe és a  $\delta$ -Proteobacteria altörzsbe tartozó szervezetek többségében szigorúan anaerob, pl. szulfát vagy vas légző anyagcsere-képessége húzódik meg. A 463 bp-nál megjelenő csúcs szinte csak a kráterhez közeli mélyebb (H4M) mintában fordult elő, amit eddig tenyésztésbe még nem vont és így leírt fajjal egyáltalán nem rendelkező OP8-as jelzésű filogenetikai leszármazási ághoz (candidate division) tartozó szekvenciák alapján azonosítottunk.

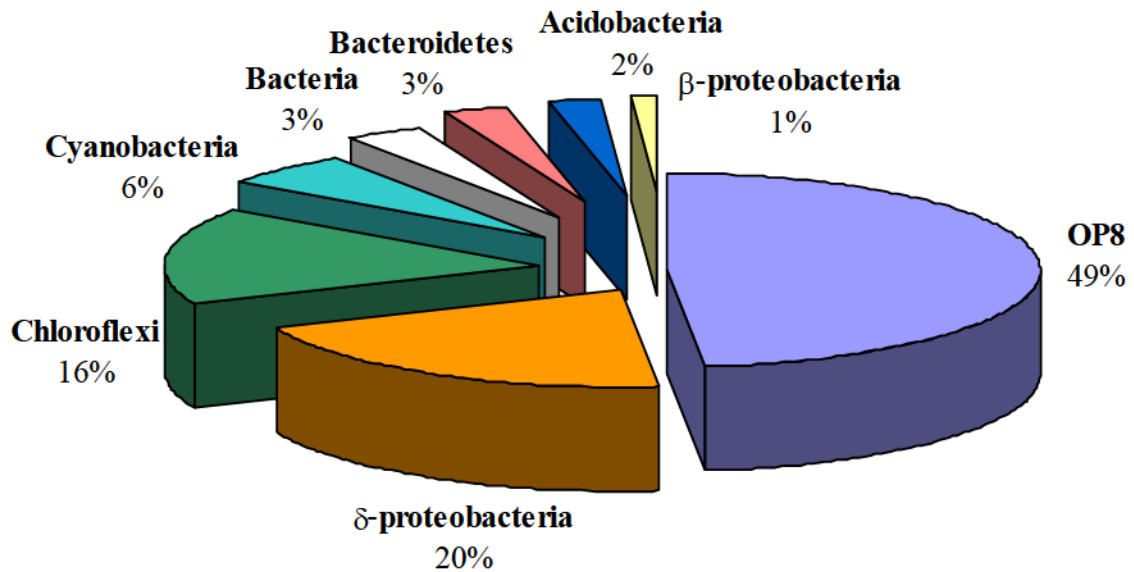


**6. ábra** A H4F, H3F, H4M és H3M minták LH-PCR kromatogramjai. A felső vízszintes skála az ampliconok méretét mutatja (bázispárban), a bal oldali függőleges skála a fluoreszcencia intenzitást

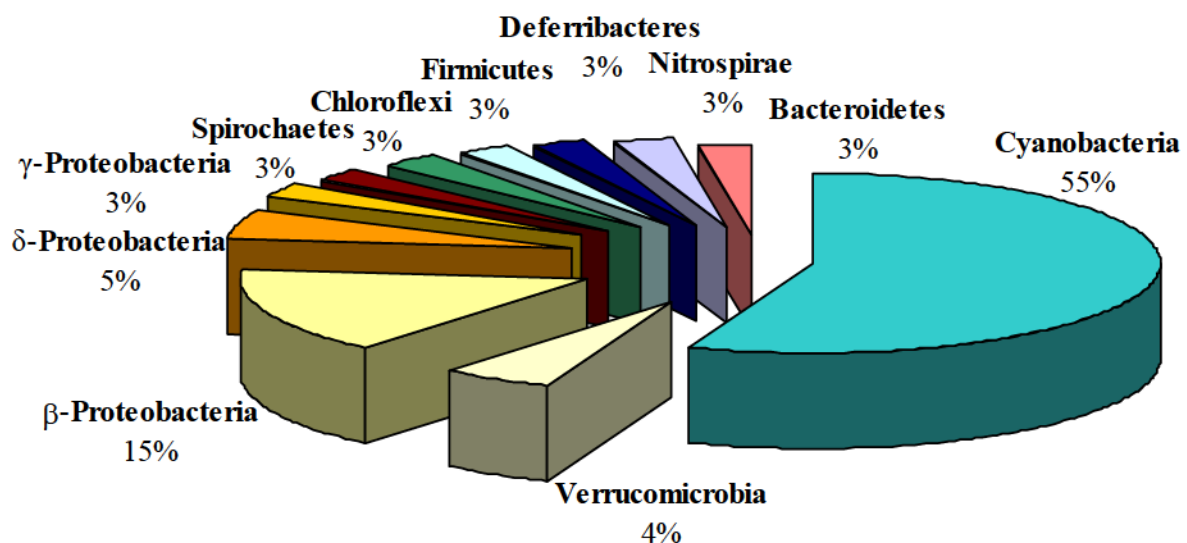
A H4M és a H3M minták kivont közösségi DNS-éből mintánként 288 és 192 tagú klónkönyvtárat hoztunk létre. Feldolgozásuk során az egyes tagok restriktions hasítását *MspI* és *BsuRI* enzimekkel végeztük, majd az agaróz gélelektroforézis után mutatott mintázatuk alapján a H3M mintát 125, a H4M mintát pedig 150 csoportba soroltuk. Az egynél nagyobb taglétszámú (major) csoportok reprezentánsainak szekvencia analízisét mindkét esetben elvégeztük. A megismert klónszekvenciák túlnyomó többsége Gram-negatív baktériumokkal mutatott nagyfokú hasonlóságot ellentétben a tenyésztésen alapuló módszerrel nyert eredményekkel. Ez a különbség adódhatott egyrészt az általunk használt táptalajok, illetve a DNS izolálás és a PCR reakciók eltérő szelektivitásából, továbbá a klónkönyvtárból kimutatott taxonok sajátos és nehezen meghatározható tenyésztési igényeiből is. A kisebb tagszám ellenére a H3-as mintavételi pont klónkönyvtára diverzebbnek bizonyult a H4-es mintavételi pontról származónál.

A H4M minta 42 taggal legdominánsabb ARDRA csoportja a legnagyobb szekvencia egyezést egy OP 8 jelzésű, eddig tenyésztésbe még nem vont képviselőket tartalmazó leszármazási ággal mutatta, amely ezen kívül még 9 - köztük 24 képviselővel a második legnagyobb - csoport tagjait is magában foglalta (7. ábra). A Proteobacteria törzset a legtöbb cso-

porttal és szekvenciával a  $\delta$ -Proteobacteria altörzs képviselte, melynek domináns szerepe az LH PCR kromatogramján is jól látszódott. A major csoportokszekvenciáinak jelentős hányada nagy hasonlóságot mutatott a Chloroflexi törzs képviselőivel. Ezen kívül a Cyanobacteria (*Synechococcus* és *Cyanothece*), a Bacteroidetes, az Acidobacteria és a  $\beta$ -Proteobacteria (*Ideonella*) fordultak még elő. Rendszertanilag nem besorolt szekvenciákkal (Bacteria) kapunk nagy egyezést 3 csoport összesen 6 képviselője esetében.



7. ábra A forráskráterhez közeli üledékmintából származó 16S rDNS alapú klónkönyvtár feldolgozásának eredményeként kapott nagyobb filogenetikai csoportok százalékos megoszlása



8. ábra A partközeli üledékmintából származó 16S rDNS alapú klónkönyvtár feldolgozásának eredményeként kapott nagyobb filogenetikai csoportok százalékos megoszlása

A H3M minta klónszekvenciáinak legnagyobb csoportját a Cyanobacteria törzs két nemzetsége képezte (*Oscillatoria* és *Cyanothece*), melyet az LH PCR eredményei is tükröztek. Emellett a Verrucomicrobia törzs, valamint a  $\beta$ -Proteobacteria (*Rhodocyclus*), a  $\gamma$ -Proteobacteria (*Beggiatoa*), és a  $\delta$ -Proteobacteria (*Geobacter*) altörzsek tagjaival megegyező klónszekvenciákat találtunk nagyobb gyakorisággal. A Chloroflexi, a Bacteroidetes, a Spirochetes és a Firmicutes törzseket – utóbbi az egyedüli Gram-pozitív szervezeteket magába foglaló csoport – a hévízi-tavi mintában 1-1 csoport képviselte 2-2 klónnal (8. ábra).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a hévízi-tavi üledékminták tenyésztésen alapuló vizsgálati eredményei alátámasztották azt a környezeti mikrobiológiában már ismert megfigyelést, hogy gyakran Gram-pozitív, és/vagy spóráképző szervezetek túlsúlya jellemzi a feltárt mikrobaközösségek összetételét, elsősorban a hagyományos, nagy szerves anyag koncentrációjú táptalajokhoz való kitűnő alkalmazkodóképességüknek és könnyű laboratóriumi fenntarthatóságuknak köszönhetően. A tenyésztéshez alkalmazott valamennyi táptalajról sikerült tenyésztésbe vonnunk aktinobaktérium törzseket, de egyik sem volt teljesen szelektív erre a csoportra nézve. A tenyésztéstől független molekuláris klónozással végzett vizsgálatok eredményei ugyanakkor számos olyan baktériumcsoport jelenlétét igazolták, melyeknek képviselőit a hagyományos tenyésztéses eljárásokkal nehéz kimutatni és az adatbázisokban fellelhető szekvenciák nagy része is ez idáig tenyésztésbe még nem vont környezeti klónok szekvenciáiból származik. Önmagában tehát mindkét módszer csak korlátozott mértékben volt alkalmas a mikrobiális diverzitás feltárására, ami alátámasztotta az alkalmazott komplex megközelítés szükségességét. A hévízi-tavi üledékminták tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független vizsgálatának eredményei a tó baktériumközösségeinek széleskörű és térben nagymértékben változó filogenetikai diverzitására utaltak, melyben több, a különleges környezeti feltételekhez adaptálódott és a tudomány számára még ismeretlen baktériumfaj kimutatása is várható.

További céljaink között szerepel:

- a klónkönyvtárak teljes feldolgozása, a minor klónok szekvenciáinak meghatározásával
- a már tenyésztésbe vont és feltehetően új fajok képviselőiként azonosított baktériumtörzsek részletes fenotípusos vizsgálata, a törzsek anyagcsere tulajdonságainak megismerésére
- egyidejűleg több üledék mintavételi pontra kiterjedő diverzitás elemzés az újonnan alkalmazott PCR alapú hosszheterogenitás (LH) és más tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerek (pl. DGGE) alkalmazásával



## 5. Irodalomjegyzék

- Adékambi, T., Raoult, D., Drancourt, M. 2006: *Mycobacterium barrassiae* sp. nov., a *Mycobacterium moriokaense* group species associated with chronic pneumonia. J. Clin. Microbiol. 44: 3493-3498.
- Barea, J. M., Navarro, E., Montoya, E. 1976: Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate solubilizing bacteria. J. Appl. Bacteriol. 40: 129-134.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., Suzuki, K. 2002: Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1441-1454.
- Clemente, F. 1981: Teresztrikus akvatikus ökoszisztémák sugárgomba-népességeinek ökofiziológiai-taxonómiai vizsgálata. Kandidátusi értekezés.
- Clemente, F. 1982: A Hévízi gyógyító bakteriológiai sajátosságai. MTA Biol. Oszt. Közl. XXV. 2-3: 339-352.
- Clemente, F., Szabó, Zs. 1982: *Micromonospora heviziensis* spec. nov. MTA Biol. Oszt. Közl. XXV. 2-3: 353-362.
- Cowan, S. T., Steel, K. J. 1974: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, England.
- Csajághy, G. 1949: A hévízi gyógyiszap kémiai, fizikai termofizikai vizsgálata. Hidrol. Közl. 29: 24-27.
- Difco Laboratories. 1962: Bacto-actinomycete isolation agar. Code 0957, Difco Supplementary Literature. Difco Laboratories, Detroit, Mich.
- Erikson, D. 1941: Studies on some lake-mud strains of *Micromonospora*. J. Bacteriol. 41: 277-300.
- Gao, B., Gupta R. S. 2005: Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2401-2412.
- Hartmans, S., De Bont, J. A. M., Stackebrandt, E. 2006: The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, S., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (eds.) The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Vol. 3. 889-918.
- Hinorouchi, S. 2007: Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 283-299.
- Jensen, H. L. 1930: The genus *Micromonospora* Ørskov, a little known group of soil microorganisms. Proc. Linn. Soc. N. S. Wales. 55: 231-248.
- Jensen, H. L. 1932: Contributions to our knowledge of the actinomycetales. III. Further observations on the genus *Micromonospora*. Linn. Soc. N. S. Wales. 57: 173-180.
- Jones, D., Keddie, R. M. 2006: The genus *Arthrobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, S., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (eds.) The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Vol. 3. 945-960.

- Kageyama, A., Morisaki, K., Omura, S., Takashashi, Y. 2008: *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 53-56.
- Kloos, W. E., Tornabene, T. G., Schleifer, K. H. 1974: Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 79-101.
- Kocur, M., Kloos, W. E., Schleifer, K. 2006: The genus *Micrococcus*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, S., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (eds.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria* Vol. 3. 961-971.
- Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Márialigeti, K. 1999: *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 167-173.
- Küster, E., Williams, S. T. 1964: Selective media for isolation of Streptomycetes. *Nature London*, 202: 928-929.
- Lee, S. D. 2008: *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 500-504.
- Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Schumann, P., Burghardt, J., Webb, R. I., Soddell, J. A., Rees, G. N. 1999: *Friedmanniella spumicola* sp. nov. and *Friedmanniella capsulata* sp. nov. from activated sludge foam: Gram-positive cocci that grow in aggregates of repeating groups of cocci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1667-1680.
- Pitcher, D. G., Noble, W. C. 1978: Aerobic diphtheroids of human skin. In: Bousefield I. J., Calley A. G. (eds.) *Coryneform Bacteria*. Academic Press, London. pp. 265-287.
- Pridham, T. G., Anderson, P., Folioy, C., Lindenfelser, H. A., Hesseltine, C. W., Benedict, R. G. 1956: A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antibiotic Annual 1956*: 947-953.
- Ruimy, R., Riegel, P., Boiron, P., Monteil, H., Cristen, R. 1995: Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small subunit ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 740-746.
- Schulhof, Ö. 1957: Magyarország ásvány- gyógyvizei. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Sharpe, M. E., Law B. A., Philips, B. A. 1976: Coryneform bacteria producing methanethiol. *J. Gen. Microbiol.* 94: 430-435.
- Solano-Serena, F., Marchal, R., Casarégola, S., Vasnier, C., Lebeault, J., Vandecasteele, J. 2000: A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2392-2399.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. 2004: *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 191-194.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., Schumann, P. 1995: Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 682-692.
- Takeuchi, M., Fang, C., Yokota, A. 1995: Taxonomic study of the genus *Brachybacterium*: proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp. nov., nom. rev., *Brachybacterium paraconglomeratum* sp. nov., and *Brachybacterium rhamnosum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 160-168.

- Tsukamura, M., 1984: The “non-pathogenic” mycobacteria: Their distribution and ecology in non-living reservoirs. *In*: Kubica G. P., Wayne L. G. (eds.) *The Mycobacteria: A Source Book*, Part B. Marcel Dekker. New York, NY. pp. 1339-1359.
- Yassin, A. F., Hupfer, H. 2006: *Williamsia deligens* sp. nov., isolated from human blood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 193-197.
- Waksman, S. A. 1961: *The Actinomycetes I-II*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Wohl, D. L., McArthur, J. V. 1998: Actinomycete-flora associated with submersed freshwater macrophytes. *FEMS Microbiol Ecol.* 26:135–140.
- Internetes hivatkozások: <http://www.dsmz.de>; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)